

B-86505

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 1月16日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-007400

[ST.10/C]:

[JP2001-007400]

出 願 人

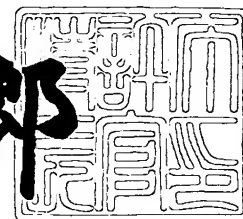
Applicant(s):

味の素株式会社

2003年 5月20日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3037317

【書類名】 特許願

【整理番号】 Y1H0861

【提出日】 平成13年 1月16日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社  
                        食品研究所内

    【氏名】 小寺 智博

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社  
                        食品研究所内

    【氏名】 丹尾 式希

【特許出願人】

    【識別番号】 000000066

    【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100059959

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 中村 稔

【選任した代理人】

    【識別番号】 100067013

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 大塚 文昭

【選任した代理人】

    【識別番号】 100082005

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 熊倉 禎男

【選任した代理人】

    【識別番号】 100065189

【弁理士】

【氏名又は名称】 宍戸 嘉一

【選任した代理人】

【識別番号】 100096194

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 英人

【選任した代理人】

【識別番号】 100074228

【弁理士】

【氏名又は名称】 今城 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100084009

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 信夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100082821

【弁理士】

【氏名又は名称】 村社 厚夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100086771

【弁理士】

【氏名又は名称】 西島 孝喜

【選任した代理人】

【識別番号】 100084663

【弁理士】

【氏名又は名称】 箱田 篤

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008604

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【ブルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アンジオテンシン変換酵素阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記(1)～(5)の構造式のいずれかで表されるペプチド、またはその塩。

(1) Tyr-Val-Val-Phe-Lys

(2) Pro-Asn-Asn-Lys-Pro-Phe-Gln

(3) Asn-Trp-Gly-Pro-Leu-Val

(4) Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr-Trp-Thr

(5) Thr-Pro-Arg-Val-Phe

【請求項 2】 請求項 1 に記載のペプチド、またはその塩を含むことを特徴とするアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項 3】 大豆タンパク質加水分解物であることを特徴とする、請求項 2 に記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤。

【請求項 4】 大豆タンパク質にプロテアーゼ D3 を作用させることを特徴とする、請求項 3 に記載のアンジオテンシン変換酵素阻害剤を製造する方法。

【請求項 5】 請求項 1 に記載のペプチド、またはその塩を含むことを特徴とする高血圧治療剤。

【請求項 6】 請求項 1 に記載のペプチド、またはその塩を含むことを特徴とする食品。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アンジオテンシン変換酵素阻害物質、特にアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドおよびその製造方法に関する。より具体的には、本発明は食品として経口摂取可能なアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドおよびその製造方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

アンジオテンシン変換酵素は、不活性なアンジオテンシン I の C 末端 His-Leu を切断し、血管収縮などの強い血圧上昇作用を有するアンジオテンシン II を生じさせる。一方では強い血管拡張作用を有するブラジキニンを分解する働きも有している昇圧系酵素である。このアンジオテンシン変換酵素の働きを阻害することにより高血圧症の治療を行うことが可能であることが知られている。当初、アンジオテンシン変換酵素阻害物質はブラジキニンが示すモルモットの回腸平滑筋収縮を増強させるペプチドとしてヘビ毒中から見いだされ、ブラジキニンポテンシエーターと呼ばれていた。

## 【 0 0 0 3 】

その後の研究で食品タンパク質の分解物、例えば、大豆、高麗人参等のタンパク質のペプシン分解物中にもアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する画分が存在することが明らかとなった。そのような例として、例えば、特開平2-62828ではヒト $\beta$ カゼイン中のペプチドフラグメントから降圧作用を有するペプチドを見いだした。さらに蛋白質分解酵素で分解したペプチドからもアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドが見いだされており、そのようなペプチドの例が、特開平8-225593(大豆タンパク質のペプシン分解物)、特開平8-269088 ( $\kappa$ カゼイングリコマクロペプチドのペプシン分解物)、特開平11-29594 (マグロ魚肉のサモアーゼ PC-10 分解物)、特開平11-335393 (高麗人参のペプシン分解物)、特開2000-4799 (ポテトプロテインのエンド型プロテイナーゼおよびエキソ型ペプチダーゼ分解物) 等においてその配列と共に報告されている。これまで報告されているアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドは一般にPro残基を含むことが多く、また、多くは疎水性の高いペプチドである。

一方、このような研究とは独立して、食品タンパク質の特性を修飾する目的で種々のタンパク質分解酵素が利用されている。例えば、本発明の出願人によりタンパク質、特に食品タンパク質を分解する酵素として活性の高いチオールプロテアーゼが報告され(特開平8-264)、このプロテアーゼ(プロテアーゼD3)をタンパク質に作用させると苦みの少ないペプチドを生成することが報告されている(特開平12-83695)。

## 【 0 0 0 4 】

【発明が解決しようとする課題】

上述したように、既に食品タンパク質の分解物中にアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する物質、特にアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチドが存在することが文献的に報告されている。しかしこれらの文献で開示されているタンパク質分解酵素は主としてペプシンやパepsin等のプロテアーゼ分解物であり、これらの酵素分解物には一般に強い苦味が存在することが知られている。そのためこれら酵素分解物をアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド含有物として経口で摂取する事は呈味の点から制限されることとなる。

従って、本発明の目的は、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する、呈味の優れたペプチド、およびそれらのペプチドの少なくとも1つを含む、アンジオテンシン変換酵素阻害物質を製造する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、発芽大豆子葉由来プロテアーゼD3が他の市販酵素と比較して低苦味性のペプチドを製造することの出来る酵素であること（特開2000-83695）、および、プロテアーゼD3による大豆タンパク質分解物中にアンジオテンシン阻害物質が存在することを見出し、この分解物を更に解析することにより本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する呈味の優れたペプチドは下記（1）～（5）の式のいずれかで表される5種のペプチドおよびその塩である。

- (1) Tyr-Val-Val-Phe-Lys（配列番号1）
- (2) Pro-Asn-Asn-Lys-Pro-Phe-Gln（配列番号2）
- (3) Asn-Trp-Gly-Pro-Leu-Val（配列番号3）
- (4) Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr-Trp-Thr（配列番号4）
- (5) Thr-Pro-Arg-Val-Phe（配列番号5）

ここで、Tyrはチロシン、Valはバリン、Pheはフェニルアラニン、Lysはリジン、Proはプロリン、Asnはアスパラギン、Glnはグルタミン、Trpはトリプトファン、Glyはグリシン、Leuはロイシン、Ileはイソロイシン、Thrはスレオニン、Argはアルギニンの各アミノ酸をそれぞれ表す。

また、本発明による、上記ペプチドを含むタンパク質分解物の製造方法は、タンパク質、特に大豆タンパク質にプロテアーゼD3を作用させることを特徴とする、タンパク質分解物製造方法である。

#### 【 0 0 0 5 】

##### 【発明の実施の形態】

本発明のペプチドを含むタンパク質分解物はタンパク質をプロテアーゼD3で消化することにより簡便かつ大量に調製することができる。

本発明のペプチドを含むタンパク質分解物を製造するために使用するプロテアーゼD3は前述したように苦みの少ないペプチドを製造することを可能とするタンパク質分解酵素である。プロテアーゼD3は、例えば発芽約10日目の大豆子葉から特開平8-264に記載した方法によって得ることができる。また、プロ配列を有する非活性型の組換え体プロテアーゼproD3から自己触媒活性化処理により活性体の組換えプロテアーゼD3 (rD3) を得ることもできる。組換え体proD3は、例えば大腸菌によって産生することができる。発芽大豆子葉由来プロテアーゼD3に関しては特開平9-121870号に記載されている。特開平9-121870号には組換え体D3として、D3- $\alpha$ とD3- $\beta$ が記載されているが、どちらも本発明のペプチドを製造するために使用できる。

#### 【 0 0 0 6 】

より具体的には、例えば、D3- $\beta$  cDNA全長を組み込んだクローンpUCa (特開平9-121870号、:FERM P-14687)を用い、プロモーターとして培地中のトリプトファンの欠乏で容易に転写が誘導されるtrpプロモーターを用いてrD3を産生することができる。必要に応じて、大腸菌内で発現しやすいようにプロモーター領域または更にその上流の配列を改変することや、コドン使用頻度を考慮してD3遺伝子のDNA配列を改変することも可能である。

trpプロモーターは強力なプロモーターであり、例えば、マダイ・トランスグルタミナーゼ (TG) 遺伝子を高発現したプラスミドpTTG2-22 (特開平6-225775) は、trpプロモーターを用いており、マダイTG遺伝子上流の配列は、E.coliにおいて異種タンパク質が高発現するようデザインされている。また、微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) 遺伝子を高発現したプラスミドpUCTRPMTG(+ )D



2 (特開平11-75876) は、このマダイTG発現プラスミドのtrpプロモーターを含む上流配列を用いており (配列表配列番号 8)、更に多コピープラスミドpUC19に組み込むことにより、MTGが高発現するようになっている。本発明においてproD3を産生する目的にこれらのプラスミドのプロモーター領域は適している。

## 【 0 0 0 7 】

自己触媒活性化による高活性型D3への変換は、例えば、特開平9-121870に記載された条件、すなわちpH 4 前後の200m塩化ナトリウム溶液中に曝し、約30～約50℃、好ましくは約35～45℃にてインキュベーションすればよい。この酵素はpH3～7、好ましくはpH3.5～5.5、温度約30～50℃、好ましくは約35～45℃でタンパク質に作用させることができる。この条件でプロテアーゼD3は極めて効率よくタンパク質を分解して本発明のペプチドを生成することができる。

## 【 0 0 0 8 】

本発明のペプチドは、大豆タンパク質、とりわけ大豆貯蔵タンパク質にプロテアーゼD3を作用させることにより製造することができる。プロテアーゼD3の基質としては精製された大豆タンパク質でも良いが、一般には単に大豆タンパク質を含む材料を破碎、懸濁、必要に応じて酸またはアルカリ処理等を行なったもの、あるいは更に遠心または濾過等により不溶性画分を除去したものも使用できる。分解は、例えば、上述したような基質の溶液を、pH 3～7好ましくはpH3.5～5.5、特に好ましくはpH4.0～5.0付近に調整し、この溶液に上述のように調製したrD3を基質／酵素比が約250/1～約1000/1程度の範囲になるように加え、約30℃～約50℃、好ましくは約35℃～約45℃にて6時間～60時間程度インキュベーションすることによって行なうことができる。インキュベーション後に、例えば加熱により酵素を失活させ、遠心分離等により上清画分を得ることができる。この上清画分をNaOH等のアルカリによって中和し、凍結乾燥等によってタンパク質分解物を回収することによって、本発明のペプチドを含む粗タンパク質分解物を得ることができる。

## 【 0 0 0 9 】

本発明のペプチドを含む粗タンパク質分解物は、更に精製することができる。精製する場合には、本発明のペプチドがいずれも分子量が654から1029の範囲に

含まれるという事実を利用することができる。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーにより2000以上の高分子量領域を除去し、続いて低分子量領域を逆相クロマトグラフィーで更に分画することができる。これらの分画のアングiotenシン変換酵素阻害活性は例えば以下のようにして確認することができる。すなわち、アングiotenシン変換酵素の基質となる物質、例えばp-ヒドロキシルベンゾイルグリシル-L-ヒスチジル-L-ロイシン、アングiotenシン変換酵素、例えば商業的に入手可能なウサギ肺アングiotenシン変換酵素、上述の部分精製画分を混合して反応させ、反応液を比色することによって測定することができる。

#### 【0010】

本発明の一つの実施態様においては、本発明のペプチドは、上述したような方法で得られたタンパク質分解物、あるいはその部分精製画分を更に精製することによって得られる。タンパク質の精製手段は一般に良く知られており、そのような手段の例として、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等が挙げることができる。

また本発明の別の実施態様においては、本発明のペプチドは化学合成される。本発明のペプチドは通常のパプチド合成法、例えば固相合成法を用いて合成することができる。そのようにして合成したペプチドは通常の手段、例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等によって精製することができる。このようなペプチド固相合成法、およびそれに続くペプチド精製はこの技術分野においてよく知られたものである。

このようにして調製されたアングiotenシン変換酵素阻害活性ペプチドはあらゆるタイプの加工食品や飲料、医療食などに利用可能である。また、本発明の方法によって調製されたタンパク質分解物も、目的に応じて適切な処理を行なった後、食品材料として使用することができる。

#### 【0011】

#### 【実施例】

#### 参考例 1. proD3発現用遺伝子構築物の作製

発芽ダイズ子葉より得たmRNAより作製したcDNAライブラリーから、常法に従い

クローニングしたD3- $\beta$  cDNA（配列表配列番号6）の一部を、E.coliで機能する発現ベクターに組み込んだ。

#### （1）trpプロモーターとD3遺伝子との連結

D3遺伝子は、D3- $\beta$  cDNA全長を組み込んだクローンpUCa（特開平9-121870号、FERM P-14687）を用いた。

D3- $\beta$  cDNAの上流に、trpプロモーターを結合させるために、PCRによりDNAフラグメントの結合を行った。まず、図1のように、MTG発現プラスミドpUCTRPMTG(+)D2（特開平11-75876）のtrpプロモーターを含む領域（配列番号8）と、pUCaのD3 cDNAの部分領域をPCRにて増幅した。trpプロモーター増幅用のプライマーはTRP-N2（配列番号9）、TRP-C2（配列番号10）、D3部分増幅用プライマーは、D3-N（配列番号11）、D3-C（配列番号12）であり、TRP-N2、D3-Nはセンスプライマー、TRP-C2、D3-Cはアンチセンスプライマーである。また、D3-Nは、trpプロモーターを含む配列と結合させるための11塩基の配列と開始コドンATGを、D3の配列番号6のアミノ酸配列番号-107位のTyr（プロ配列の開始と推定される）をコードするTAC以下の配列に付加させるようデザインしており、この配列は、TRP-C2中の配列と相補的である。D3-Cには、HindIIIサイトを導入した。

#### 【0012】

まず、pUCTRPMTG(+)D2に対してプライマーTRP-N2とTRP-C2、pUCaに対してプライマーD3-NとD3-Cで、PCRをそれぞれ94℃で30秒、55℃1分、72℃で2分の条件で35サイクル行った。各PCR産物をフェノール／クロロホルムで抽出した後、エタノール沈殿を行い、100  $\mu$ LのH<sub>2</sub>Oに溶解した。

各PCR産物から1  $\mu$ Lずつとって混ぜ、94℃で10分間熱変性した後、プライマーTRP-N2とD3-Cで、PCRを94℃で30秒、55℃1分、72℃で2分の条件で35サイクル行った。

2回目のPCR産物をフェノール／クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿したものを、HindIII、EcoRIで消化し、pUC18にサブクローニングし、pUCTRProD3-Nを得（図1）、シーケンスを確認した。

#### 【0013】

## (2) C末配列への終始コドン導入

D3- $\beta$  のC末端に、終始コドンを導入するために、PCRにより行った。プライマーは、センスプライマーD3-N2（配列表配列番号13）、アンチセンスプライマーD3-C2（配列表配列番号14）を用いた。なお、D3-C2は、配列番号6のアミノ酸配列の248番目のCysをコードするTGTを終始コドンであるTGAに変異させるためのプライマーである。

pUC $\alpha$ に対してプライマーD3-N2とD3-C2で、PCRを94℃で30秒、55℃で1分、72℃で2分の条件で35サイクル行った。各PCR産物をフェノール/クロロホルムで抽出した後、pUC18のSma I サイトにクローニングし、pUC-D3-Cを得（図2）、シーケンスを確認した。

【0014】

## &lt;配列表フリーテキスト&gt;

配列番号8：pUCTRPMTG(+)D2のプロモーター領域

配列番号9，10：trpプロモーター領域の増幅のためのPCRプライマー

配列番号11，12：D3領域の増幅のためのPCRプライマー

配列番号13，14：trpプロモーター領域とD3領域に結合するためのPCRプライマー

【0015】

## (3) proD3発現プラスミドの構築

このようにして得られたプラスミドの部分断片を用いて、trpプロモーターによるproD3発現プラスミドを完成させた。すなわち、pUCTRPproD3-NのSacII-HindIII断片（大）とpUC-D3-CのSacII-HindIII断片（小）を結合し、pUCTRPproD3を得た（図3）。

【0016】

## 参考例2. proD3の発現及び成熟D3の取得

参考例1に従って得られたproD3発現プラスミドを大腸菌で発現させ、最終的に活性体のD3を得た。

(1) pUCTRPpD3で形質転換した大腸菌JM109株（宝酒造）を、アンピシリンを含む寒天培地で選択し形質転換体を得た。この形質転換体をアンピシリンを含むM

9-カザミノ酸培地に接種し、37℃で約20時間培養とした。その結果、目的のD3遺伝子産物は、タンパク質封入体として菌体内に蓄積した。

集菌後、菌体を超音波破碎し、遠心によってタンパク質封入体を回収した。このタンパク質封入体を洗浄後、8M尿素-10mMジチオトレイトール-50mM塩化ナトリウム-50mMトリス・塩酸-5mMエチレンジアミン四酢酸溶液（pH 8）に、溶解した。これを可溶化proD3溶液と呼ぶ。可溶化proD3溶液中の変性proD3の天然型立体構造を有するproD3への立体構造の再変換（巻き戻し）は以下の方法で行った。

#### 【 0 0 1 7 】

あらかじめ1mM還元型グルタチオン-0.1~0.5mM酸化型グルタチオン-50mMリン酸カリウム-5mMエチレンジアミン四酢酸溶液（pH10.5）で平衡化させたPD-10カラム（アマシャムファルマシアバイオテック）に2.5mlの可溶化proD3溶液を添加し、その後50mMリン酸カリウム緩衝液（pH10.5）を3.5ml添加して、その溶出液を巻き戻したproD3として回収した。

#### 【 0 0 1 8 】

##### （2）自己触媒的活性化

巻き戻したproD3溶液をpH4.5前後、37℃でインキュベーションした。この結果、分子量約41kのproD3は自己触媒的に分子量約30kの高活性型のD3に変換された。この高活性型D3をタンパク質分解に使用した。

#### 【 0 0 1 9 】

##### 実施例 1. D3分解物の調製

分離大豆蛋白質溶液をpH4.5付近に塩酸で調整した。この分離大豆蛋白質溶液にrD3を基質/酵素=500/1となるように加え、37℃で24時間反応させた。反応終了後、加熱処理により酵素を失活し遠心分離で上清画分を得た。上清部分のpHをNaOHで中性付近に中和し、凍結乾燥により酵素分解ペプチドを得た。

#### 【 0 0 2 0 】

##### 実施例 2. アンジオテンシン変換酵素阻害候補ペプチドの同定

実施例 1 に記載したように調製したペプチドを5mg/mlに溶解し、濾過後ゲル濾過カラム(Superdex75 HR 10/30 ; アメルシャムファルマシアバイオテック社製)に

供し、分子量2000以下のフラクションを7画分に分画した。移動相は0.05%TFAを用い、流速は0.5ml/min、検出は215nmの吸収を測定した。各フラクションのアンジオテンシン変換酵素阻害活性を測定し、阻害活性が認められたG1～G5の5画分（図4、G1画分：フラクションNo.10および11、G2画分：フラクションNo.12および13、G3画分：フラクションNo.14および15、G4画分：フラクションNo.16および17、G5画分：フラクションNo.18-21）を濃縮遠心機により乾燥させた。

## 【 0 0 2 1 】

続いてゲル濾過で得られた活性画分を逆相HPLC COSMOSIL 5C18 AR4.6/250（ナカライテスク社製）を用いて分画した。移動相はA液（0.05% TFA含有蒸留水）、B液（0.065% TFA含有アセトニトリル）を使用し、B液が50分間で0%→50%の濃度勾配法により流速0.75ml/minでクロマトグラフィーを行った。0.75mlずつ分画し、B液濃度勾配が20%から30%付近でアンジオテンシン変換酵素阻害活性が高い傾向に見られた（図5）。

それらの画分をMS/MS分析に供してペプチドの配列を求め、74個のアンジオテンシン変換酵素阻害活性候補ペプチドが得られた。

候補ペプチドのうち、大量調製を考慮し、その配列から貯蔵タンパク質由来であることが予想され、かつPro残基を含んでいる、あるいはペプチドの疎水性度が高いと予想される5種類のペプチドを選択した。

## 【 0 0 2 2 】

## 実施例3. アンジオテンシン変換酵素阻害候補ペプチドの合成

これら候補ペプチドのアンジオテンシン変換酵素阻害活性の有無を明らかにするため固相法によりペプチドを合成した。以下にTyr-Val-Val-Phe-Lysの合成法を示す。Fmoc-Lys樹脂（Fmoc-Lys-OHが0.48mmol/g樹脂の割合で導入されているp-アルコキシベンジルアルコール樹脂；ノババイオケム社製）50mgをDMF（1ml）に懸濁し1時間振とうし樹脂を膨潤させた。

## 【 0 0 2 3 】

これを以下のFmoc基除去サイクルとFmocアミノ酸縮合サイクルに供した。

- a) DMF 1 ml中、1分間振とう（1回）。
- b) 50%ピペリジン-DMF溶液600  $\mu$  l中、12分間振とうする。

- c) DMF600  $\mu$  l で 5 回洗浄する。
- d) イソプロパノール 1 ml で 1 回洗浄する。
- e) Fmoc基除去サイクルで得られた樹脂をDMF 1 ml で 2 回振とうすることで膨潤させる。
- f) Fmoc-Phe-OH(15mg)とHOBt(8mg)をDMF800  $\mu$  l に溶かして加え、1 M ジシクロヘキシルカルバジイミド塩化メチレン溶液50  $\mu$  l を添加し、60分間振とうする。
- g) DMF 1 ml で 2 回洗浄する。
- h) イソプロパノール 1 ml で 2 回洗浄する。

【 0 0 2 4 】

以下同様に、Fmoc基除去サイクル（a - d）とFmocアミノ酸縮合サイクル（f - h）を繰り返してFmoc-Val-OH、Fmoc-Val-OH、およびFmoc-Tyr(But)-OH（いずれもノババイオケム社製）を順次縮合し、Fmoc-Tyr-Val-Val-Phe-Lys樹脂を得た。

【 0 0 2 5 】

次に、上記保護ペプチド樹脂を50%ピペリジン-DMF溶液で処理してFmoc基を除去した後、以下の脱保護工程に供した。

- a) エーテルを 1 ml 加え、1 2 分間振とうする。
- b) 遠心濃縮機を使用して乾燥させる。
- c) 1 ml のフェノール-水-トリオアニソール-エタンジオール-TFA(1.42:1.4:1.5:0.9:24.9)を加え、60分間振とうする。
- d) 樹脂を除去し、残った樹脂を 1 ml の T F A で 2 回洗浄、溶液をあわせる。
- e) エーテルを10ml加える、水を 1 ml 加えて水相部分を分画する。
- f) さらに水相部分をエーテルで 2 回洗浄する。
- g) 凍結乾燥して粗ペプチドを得る。

【 0 0 2 6 】

上記の粗ペプチドはInertsil ODSカラム（GLサイエンス社製）を用いた逆相クロマトグラフィー分析で単一ピークを示した。また、表 1 に示したように質量分析の結果は理論値と一致した。他のペプチドについても前記と同様の反応、処理

を行い表 1 に示したペプチドを合成した。

【 0 0 2 7 】

【表 1】

ペプチド	質量分析	(理論値)
Tyr-Val-Val-Phe-Lys	655.2	(654.8)
Pro-Asn-Asn-Lys-Pro-Phe-Gln	844.6	(843.9)
Asn-Trp-Gly-Pro-Leu-Val	685.6	(684.8)
Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr-Trp-Thr	522.5	(521.6)
Thr-Pro-Arg-Val-Phe	655.6	(654.8)

【 0 0 2 8 】

#### 実施例 4. アンジオテンシン変換酵素阻害候補ペプチドの阻害活性の測定

各ペプチド試料溶液50  $\mu$  l に125  $\mu$  l の10mM p-ヒドロキシルベンゾイルグリシル-L-ヒスチジル-L-ロイシン、2.5mM 4-アミノアンチピリン、3 ユニット/mlヒプリカーゼ (0.7M塩化ナトリウム含む0.2Mホウ酸緩衝液の溶液) を加え、37℃で3 分間プレインキュベーションした。200mU/mlのウサギ肺アンジオテンシン変換酵素 (シグマ社製) を20  $\mu$  l 加え反応を開始した。37℃、20分間インキュベーション後、375  $\mu$  l の3 mM EDTA、0.2%トライトン X-100、6.5mM過ヨウ素酸ナトリウム溶液を加え反応を停止した。その後さらに3 分間インキュベーションして発色させ、反応溶液を波長505nmで比色定量した。対照として精製水を使用した。阻害率50%のペプチド濃度をIC<sub>50</sub>値として表 2 に示した。ポジティブコントロールとして本測定法でのブラジキニンポテンシエーターC (ペプチド研究所製) のIC<sub>50</sub>値を示した。



【 0 0 2 9 】

【表 2】

ペプチド	IC <sub>50</sub> (μM)
Tyr-Val-Val-Phe-Lys	44
Pro-Asn-Asn-Lys-Pro-Phe-Gln	33
Asn-Trp-Gly-Pro-Leu-Val	21
Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr-Trp-Thr	64
Thr-Pro-Arg-Val-Phe	200
ブラジキニンポテンシエーター C	35

【 0 0 3 0 】

## 【発明の効果】

大豆タンパク質により、呈味性の優れた生理活性ペプチド素材、すなわち、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドが提供される。また、本発明のアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド製造方法によって、低苦味性のアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドを含む酵素分解物を製造することができる。従って、本発明のアンジオテンシン変換酵素阻害ペプチドおよび前記ペプチドを含むタンパク質分解物は広範囲な食品に利用することが可能である。

【 0 0 3 1 】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Ajinomoto Co., Inc.

<120> Angiotensin converting enzyme inhibitor and a method of  
producing the inhibitor

&lt;130&gt; Y1H0861

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 1

Tyr Val Val Phe Lys

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 2

Pro Asn Asn Lys Pro Phe Gln

1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 3

Asn Trp Gly Pro Leu Val

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 4

Ile Pro Pro Gly Val Pro Tyr Trp Thr

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 5

Thr Pro Arg Val Phe

1 5

<210> 6

<211> 1392

<212> DNA

<213> Glycine max

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (397)..(1392)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1392)

<400> 6

atg acc atg gct gcg atc gtg ctc ctg ttc acg gtc ttt gcc gtt tcc 48

Met Thr Met Ala Ala Ile Val Leu Leu Phe Thr Val Phe Ala Val Ser

-130

-125

-120

tcc gcc cta gac atg tcg ata atc tcg tac gac agc gcc cac gcg gac 96

Ser Ala Leu Asp Met Ser Ile Ile Ser Tyr Asp Ser Ala His Ala Asp

-115

-110

-105

aag gcc gcc acg ttg cgc acc gag gag gag ctg atg tcc atg tac gag 144

Lys Ala Ala Thr Leu Arg Thr Glu Glu Glu Leu Met Ser Met Tyr Glu

-100

-95

-90

-85

cag tgg ctc gtg aag cac ggg aag gtg tac aac gcg ctc ggc gag aag 192

Gln Trp Leu Val Lys His Gly Lys Val Tyr Asn Ala Leu Gly Glu Lys

-80

-75

-70

gag aag cgc ttc cag atc ttc aag gac aac ctg cga ttc atc gac gac 240  
Glu Lys Arg Phe Gln Ile Phe Lys Asp Asn Leu Arg Phe Ile Asp Asp

-65

-60

-55

cac aac tcc gcg gag gac cga acc tac aag ctc gga ctg aac cgg ttc 288  
His Asn Ser Ala Glu Asp Arg Thr Tyr Lys Leu Gly Leu Asn Arg Phe

-50

-45

-40

gct gat ctc acc aac gag gaa tac agg gcc aag tac ttg gga acc aag 336  
Ala Asp Leu Thr Asn Glu Glu Tyr Arg Ala Lys Tyr Leu Gly Thr Lys

-35

-30

-25

atc gat ccc aac cgg agg ctc gga aag acc ccg agc aac cgc tac gcg 384  
Ile Asp Pro Asn Arg Arg Leu Gly Lys Thr Pro Ser Asn Arg Tyr Ala

-20

-15

-10

-5

cca cgt gtc ggc gac aaa ttg cct gat tcc gtt gat tgg agg aag gaa 432  
Pro Arg Val Gly Asp Lys Leu Pro Asp Ser Val Asp Trp Arg Lys Glu

-1

1

5

10

ggt gct gtt cct cct gtc aaa gac caa gga ggc tgt ggg agc tgt tgg 480  
Gly Ala Val Pro Pro Val Lys Asp Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp

15

20

25

gca ttc tca gca atc ggt gca gta gaa gga ata aat aag ata gta aca 528  
Ala Phe Ser Ala Ile Gly Ala Val Glu Gly Ile Asn Lys Ile Val Thr

30

35

40

ggc gaa ctg att tcg tta tca gaa caa gaa ttg gtg gat tgt gat act 576

Gly Glu Leu Ile Ser Leu Ser Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Asp Thr  
45 50 55 60

gga tat aac caa gga tgc aat gga gga ctt atg gac tat gca ttt gag 624  
Gly Tyr Asn Gln Gly Cys Asn Gly Gly Leu Met Asp Tyr Ala Phe Glu  
65 70 75

ttc ata atc aac aat ggc ggc att gat tct gat gag gat tac cca tac 672  
Phe Ile Ile Asn Asn Gly Gly Ile Asp Ser Asp Glu Asp Tyr Pro Tyr  
80 85 90

cgt ggt gtt gat ggt aga tgc gac aca tat agg aaa aat gct aaa gtc 720  
Arg Gly Val Asp Gly Arg Cys Asp Thr Tyr Arg Lys Asn Ala Lys Val  
95 100 105

gtt tct att gat gac tac gaa gat gtt cct gcc tat gat gag tta gcc 768  
Val Ser Ile Asp Asp Tyr Glu Asp Val Pro Ala Tyr Asp Glu Leu Ala  
110 115 120

ttg aaa aag gcc gtt gca aat cag ccc gtg agc gtt gct att gaa gga 816  
Leu Lys Lys Ala Val Ala Asn Gln Pro Val Ser Val Ala Ile Glu Gly  
125 130 135 140

ggg ggc agg gaa ttt caa tta tat gta tct ggt gta ttc acg ggg aga 864  
Gly Gly Arg Glu Phe Gln Leu Tyr Val Ser Gly Val Phe Thr Gly Arg  
145 150 155

tgt ggc aca gca cta gat cat ggt gtc gtg gct gtt ggg tat gga aca 912  
Cys Gly Thr Ala Leu Asp His Gly Val Val Ala Val Gly Tyr Gly Thr

160	165	170	
gct aaa ggt cat gat tat tgg atc gta agg aat tca tgg ggt tct agc 960			
Ala Lys Gly His Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Gly Ser Ser			
175	180	185	
tgg gga gag gat ggc tac atc aga tta gaa aga aat ctt gct aac agc 1008			
Trp Gly Glu Asp Gly Tyr Ile Arg Leu Glu Arg Asn Leu Ala Asn Ser			
190	195	200	
aga tca ggc aag tgt gga att gca att gag cca tct tat ccc ctt aag 1056			
Arg Ser Gly Lys Cys Gly Ile Ala Ile Glu Pro Ser Tyr Pro Leu Lys			
205	210	215	220
aat ggt cca aat ccc cct aat cct gga cca tca ccc cct tca cct gtg 1104			
Asn Gly Pro Asn Pro Pro Asn Pro Gly Pro Ser Pro Pro Ser Pro Val			
225	230	235	
aag ccg cca aat gtc tgt gac aac tac tac agc tgt gct gat agt gct 1152			
Lys Pro Pro Asn Val Cys Asp Asn Tyr Tyr Ser Cys Ala Asp Ser Ala			
240	245	250	
act tgt tgc tgt att ttt gag ttc gga aat gct tgc ttc gag tgg ggt 1200			
Thr Cys Cys Cys Ile Phe Glu Phe Gly Asn Ala Cys Phe Glu Trp Gly			
255	260	265	
tgc tgt cct ctt gag ggt gct tcc tgc tgt gat gac cac tac agt tgc 1248			
Cys Cys Pro Leu Glu Gly Ala Ser Cys Cys Asp Asp His Tyr Ser Cys			
270	275	280	

tgc cct gca gac tat ccc atc tgc aac act tac gct gga act tgt ctc 1296  
 Cys Pro Ala Asp Tyr Pro Ile Cys Asn Thr Tyr Ala Gly Thr Cys Leu  
 285 290 295 300

agg agc aag aac aac ccc ttt gga gtg aag gca tta agg cgt act cca 1344  
 Arg Ser Lys Asn Asn Pro Phe Gly Val Lys Ala Leu Arg Arg Thr Pro  
 305 310 315

gcg aaa ccc cat tgg acc ttc gga cgt aag aac aag gtc agc agt gct 1392  
 Ala Lys Pro His Trp Thr Phe Gly Arg Lys Asn Lys Val Ser Ser Ala  
 320 325 330

<210> 7

<211> 464

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 7

Met Thr Met Ala Ala Ile Val Leu Leu Phe Thr Val Phe Ala Val Ser  
 -130 -125 -120

Ser Ala Leu Asp Met Ser Ile Ile Ser Tyr Asp Ser Ala His Ala Asp  
 -115 -110 -105

Lys Ala Ala Thr Leu Arg Thr Glu Glu Glu Leu Met Ser Met Tyr Glu  
 -100 -95 -90 -85



Gln Trp Leu Val Lys His Gly Lys Val Tyr Asn Ala Leu Gly Glu Lys  
-80 -75 -70

Glu Lys Arg Phe Gln Ile Phe Lys Asp Asn Leu Arg Phe Ile Asp Asp  
-65 -60 -55

His Asn Ser Ala Glu Asp Arg Thr Tyr Lys Leu Gly Leu Asn Arg Phe  
-50 -45 -40

Ala Asp Leu Thr Asn Glu Glu Tyr Arg Ala Lys Tyr Leu Gly Thr Lys  
-35 -30 -25

Ile Asp Pro Asn Arg Arg Leu Gly Lys Thr Pro Ser Asn Arg Tyr Ala  
-20 -15 -10 -5

Pro Arg Val Gly Asp Lys Leu Pro Asp Ser Val Asp Trp Arg Lys Glu  
-1 1 5 10

Gly Ala Val Pro Pro Val Lys Asp Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp  
15 20 25

Ala Phe Ser Ala Ile Gly Ala Val Glu Gly Ile Asn Lys Ile Val Thr  
30 35 40

Gly Glu Leu Ile Ser Leu Ser Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Asp Thr  
45 50 55 60

Gly Tyr Asn Gln Gly Cys Asn Gly Gly Leu Met Asp Tyr Ala Phe Glu  
65 70 75

Phe Ile Ile Asn Asn Gly Gly Ile Asp Ser Asp Glu Asp Tyr Pro Tyr

80

85

90

Arg Gly Val Asp Gly Arg Cys Asp Thr Tyr Arg Lys Asn Ala Lys Val

95

100

105

Val Ser Ile Asp Asp Tyr Glu Asp Val Pro Ala Tyr Asp Glu Leu Ala

110

115

120

Leu Lys Lys Ala Val Ala Asn Gln Pro Val Ser Val Ala Ile Glu Gly

125

130

135

140

Gly Gly Arg Glu Phe Gln Leu Tyr Val Ser Gly Val Phe Thr Gly Arg

145

150

155

Cys Gly Thr Ala Leu Asp His Gly Val Val Ala Val Gly Tyr Gly Thr

160

165

170

Ala Lys Gly His Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Gly Ser Ser

175

180

185

Trp Gly Glu Asp Gly Tyr Ile Arg Leu Glu Arg Asn Leu Ala Asn Ser

190

195

200

Arg Ser Gly Lys Cys Gly Ile Ala Ile Glu Pro Ser Tyr Pro Leu Lys

205

210

215

220

Asn Gly Pro Asn Pro Pro Asn Pro Gly Pro Ser Pro Pro Ser Pro Val

	225	230	235
Lys Pro Pro Asn Val Cys Asp Asn Tyr Tyr Ser Cys Ala Asp Ser Ala			
	240	245	250
Thr Cys Cys Cys Ile Phe Glu Phe Gly Asn Ala Cys Phe Glu Trp Gly			
	255	260	265
Cys Cys Pro Leu Glu Gly Ala Ser Cys Cys Asp Asp His Tyr Ser Cys			
	270	275	280
Cys Pro Ala Asp Tyr Pro Ile Cys Asn Thr Tyr Ala Gly Thr Cys Leu			
285	290	295	300
Arg Ser Lys Asn Asn Pro Phe Gly Val Lys Ala Leu Arg Arg Thr Pro			
	305	310	315
Ala Lys Pro His Trp Thr Phe Gly Arg Lys Asn Lys Val Ser Ser Ala			
	320	325	330

<210> 8

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:promoter region

of pUCTRPMTG(+ )D2

<400> 8

cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttgccgc ttcattaatg cagctggcac 60  
gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc 120  
actcattagg caccacaggc tttacacttt atgcttcgg atcgtatgtt gtgtggaatt 180  
gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagcttgca 240  
tgcctgcagg tcgccctttc gtcttcaaga attcccctgt tgacaattaa tcatcgaact 300  
agttaactag tacgcaagtt cacgtaaaaa gggtatcgat tagtaaggag gtttaaa 357

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for  
amplifying trp promoter region

<400> 9

cgcccaatac gcaaaccgcc 20

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for  
amplifying trp promoter region

<400> 10

tttaaaccctc cttactaatc gataccc

27

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for  
amplifying D3 region

<400> 11

ggagggtttaa aatgtacgac agcgcccacg cg

32

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for  
amplifying D3 region

<400> 12

caagcttgta ggttcggtcc tcc

23

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for  
linking trp promoter region to D3 region

<400> 13

tacgacagcg cccacgcgga caagg

25

<210> 14

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for  
linking trp promoter region to D3 region

<400> 14

gggatcctca gctgtagtag ttgtcacaga catttgg

37

【図面の簡単な説明】

【図 1】

プラスミドpUCTRPproD3-Nの構築手順を示した図である。pUCTRPproD3-NはpUCTRPMTG(+)D2trpに由来するプロモータ領域およびD3のプロ配列部をコードする配列を有する。

【図 2】

プラスミドpUC-D3-Cの構築手順を示した図である。pUC-D3-CはD3のプロ配列および成熟D3配列部分をコードする配列を有する。

【図 3】

プラスミドpUCTRPproD3の構築手順を示した図である。pUCTRPproD3はpUCTRPMTG(+)D2trpに由来するプロモータ領域、D3のプロ配列および成熟D3配列部分をコードする配列を有する。

【図 4】

プロテアーゼD3を作用させた分離大豆タンパク質溶液のゲル濾過の溶出パターンおよびアンジオテンシン変換酵素阻害活性を示す。□は215nmにおける吸光度を表し、●は酵素阻害率（％）を表す。

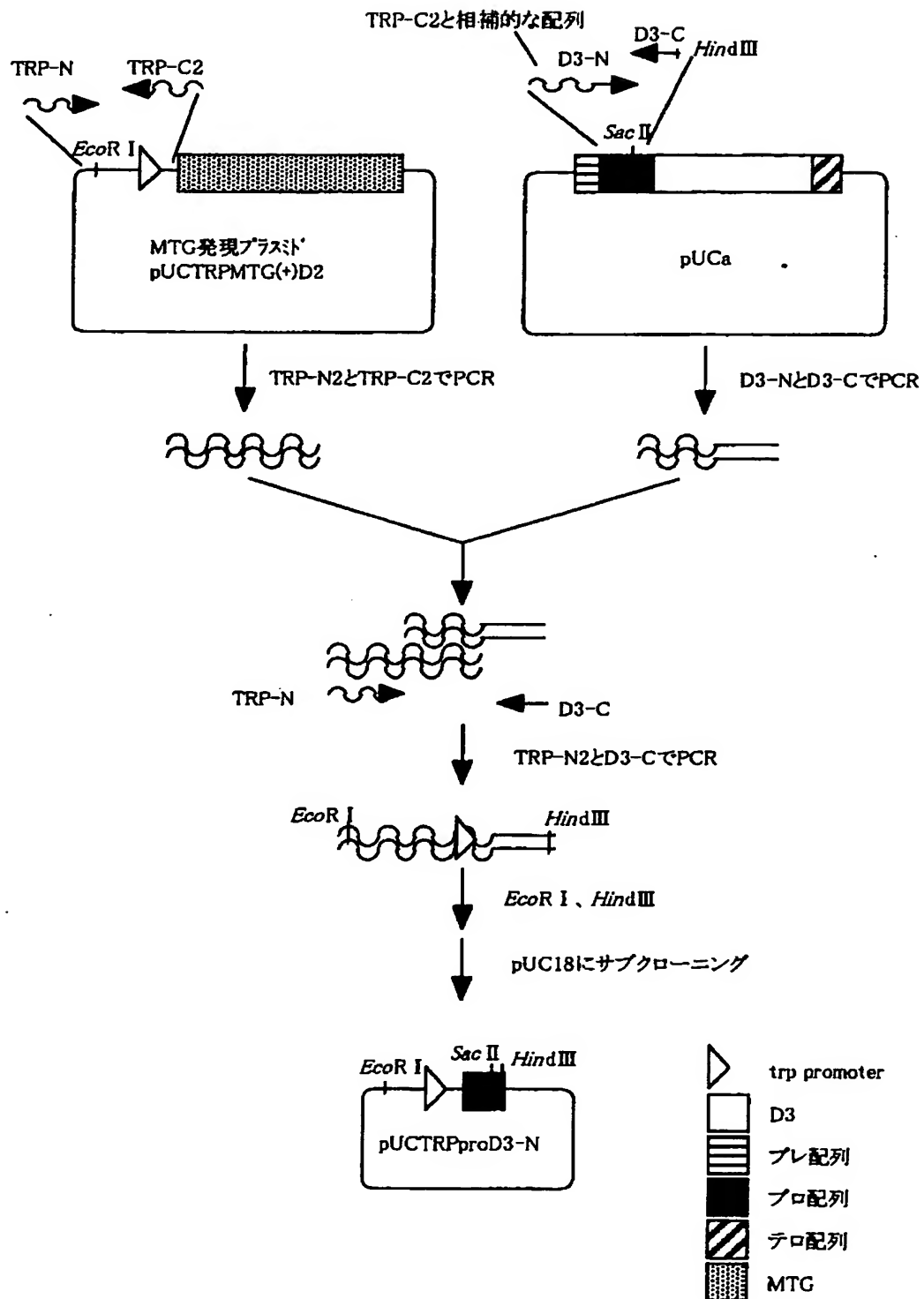
【図 5】

プロテアーゼD3を作用させた分離大豆タンパク質溶液のゲル濾過後の、アンジオテンシン変換酵素阻害活性を示す各画分の逆相カラムクロマトグラフィーの溶出パターンおよびアンジオテンシン変換酵素阻害活性を示す。□は215nmの吸光度を表し、●は酵素阻害率（％）を表す。

【書類名】

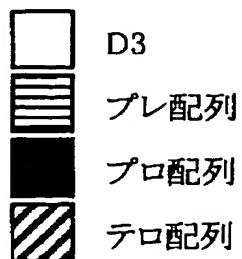
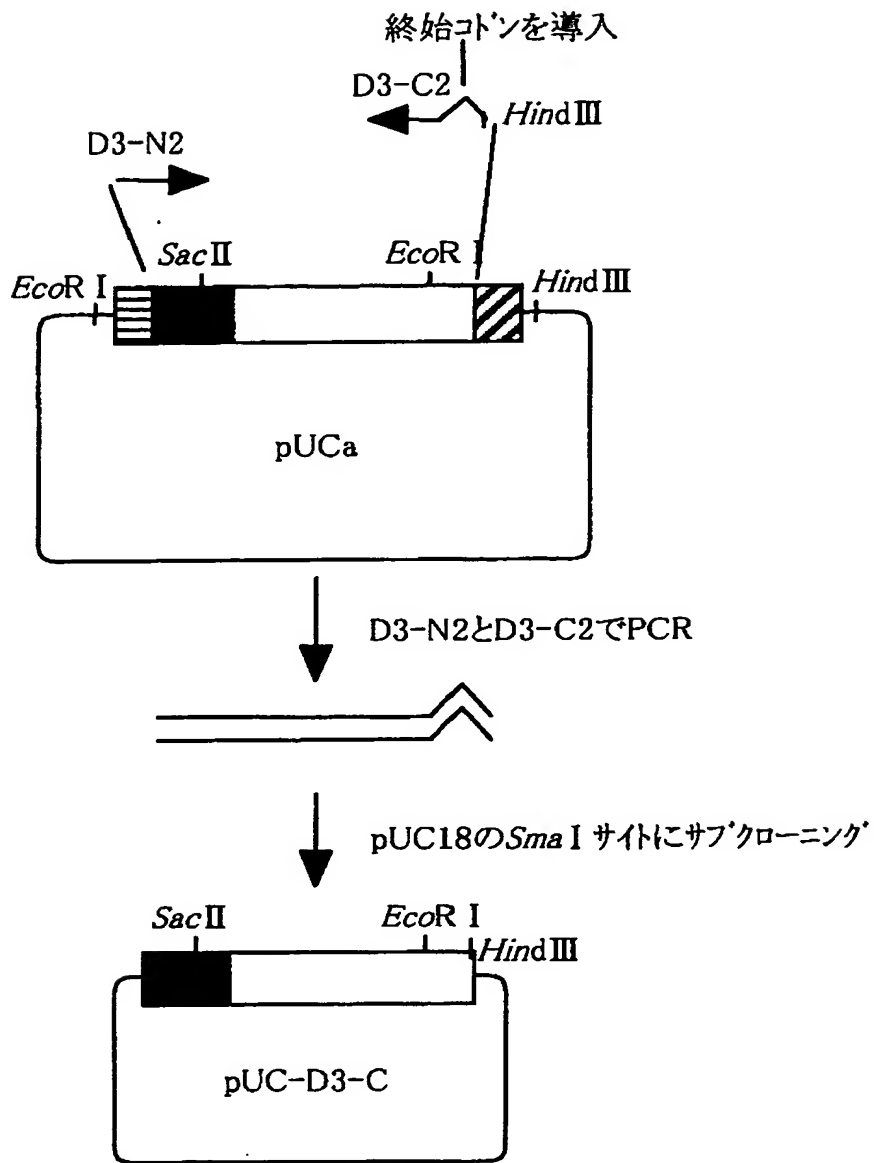
図面

【図 1】

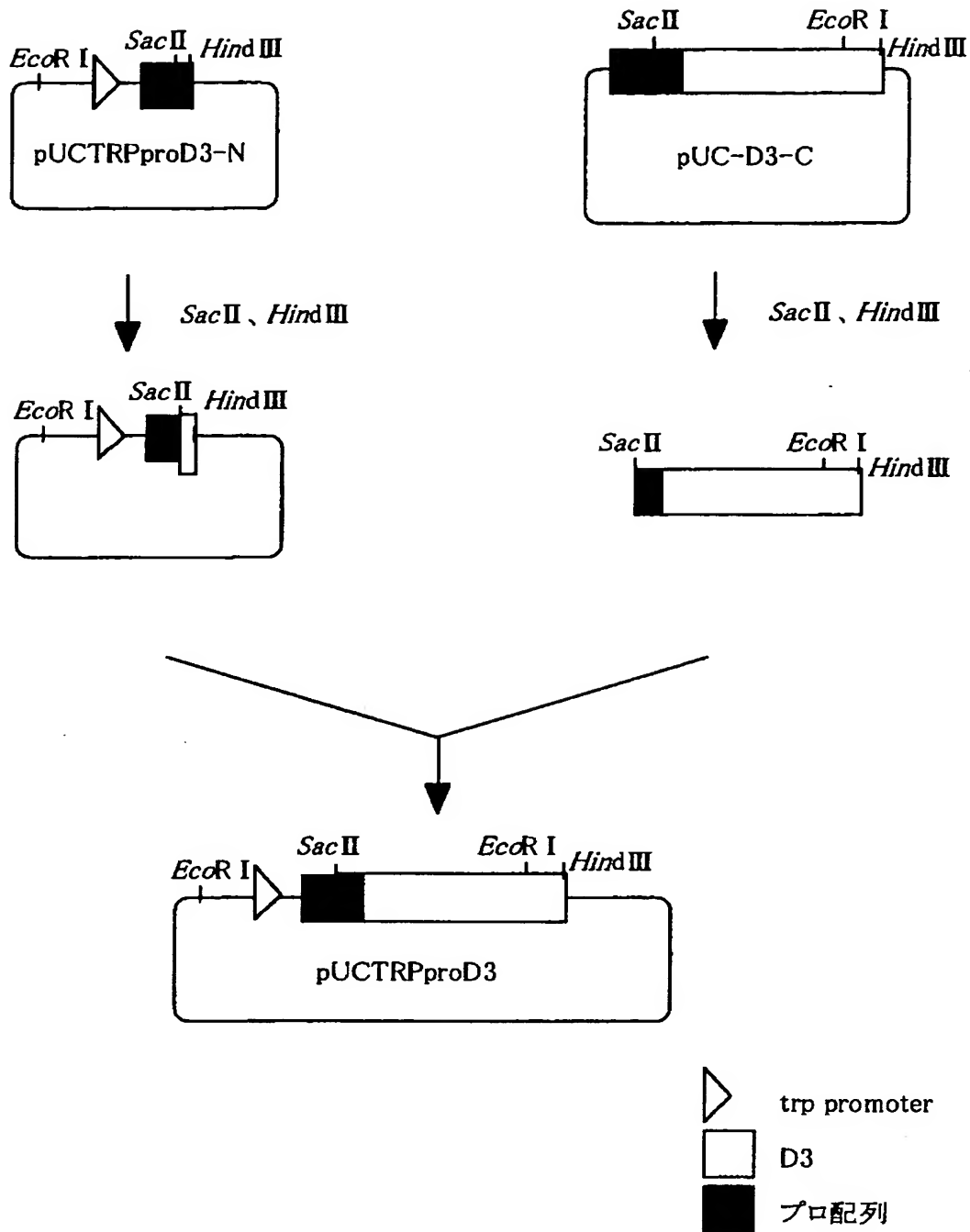




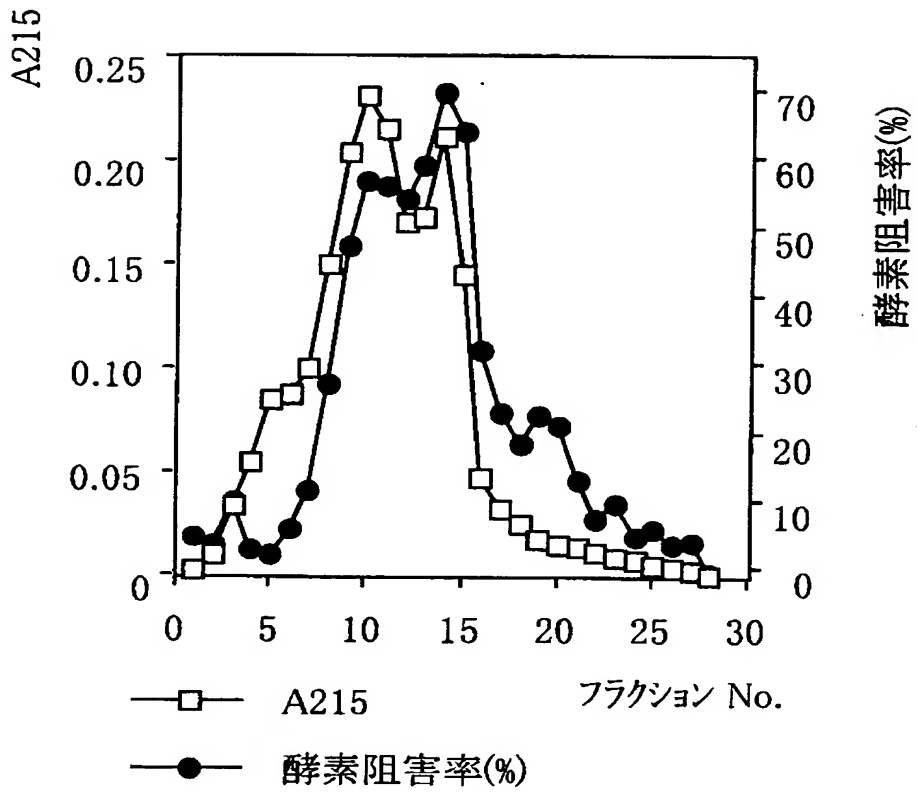
【図 2】



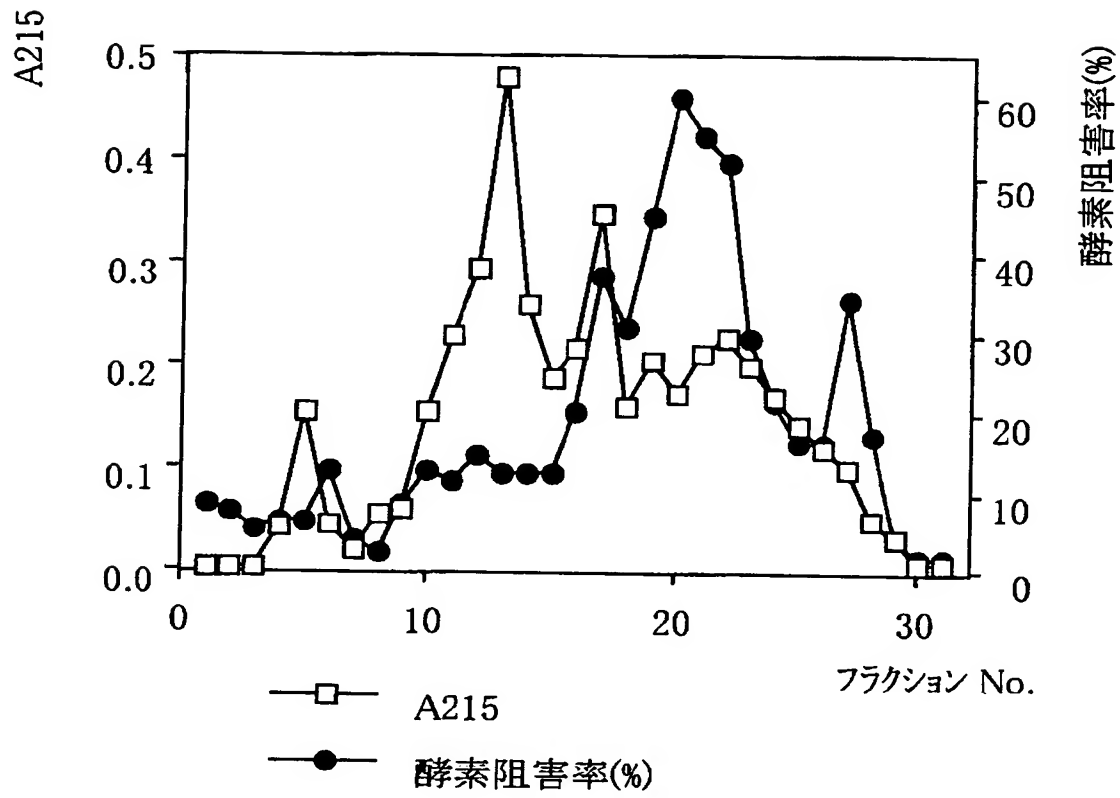
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アンジオテンシン変換酵素阻害活性を有する、呈味性の優れたペプチドまたはその塩、およびそれらの少なくとも1つを含むアンジオテンシン変換酵素阻害物質を製造する方法を提供すること。

【解決手段】 下記(1)～(5)の式のいずれかで表される5種のペプチドまたはその塩、それらを含む大豆タンパク質分解物、および、プロテアーゼD3によって大豆タンパク質を分解することを特徴とするこれらのペプチドまたはその塩を製造する方法。

(1) Tyr-Val-Val-Phe-Lys

(2) Pro-Asn-Asn-Lys-Pro-Phe-Gln

(3) Asn-Trp-Gly-Pro-Leu-Val

(4) Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr-Trp-Thr

(5) Thr-Pro-Arg-Val-Phe

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 0 0 6 6 ]

1. 変更年月日 1 9 9 1 年 7 月 2 日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号  
氏 名 味の素株式会社